

PENULENAN DAN PENJUJUKAN PROTEIN HIRUDIN DARIPADA
LINTAH TEMPATAN (*Hirudinaria manillensis*)
BAGI PENGHASILAN PROTEIN HIRUDIN
SECARA SKALA BESAR PADA PERINGKAT INDUSTRI

Dr. Fazilah Abdul Latif dan Norizah Salim
Jabatan Kejuruteraan Bioproses
Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Sumber Asli
Universiti Teknologi Malaysia
Jalan Semarak, Kuala Lumpur.

Abstrak

Fokus penyelidikan ini adalah untuk menuliskan protein hirudin dari lintah tempatan, *Hirudinaria manillensis*. Hirudin adalah antikoagulan semulajadi yang dirembeskan oleh kelenjar liur lintah. Ia mempunyai kepentingan dalam bidang perubatan kerana ia boleh berfungsi secara berkesan menyekat pembentukan thrombus bagi menghalang proses pembekuan darah. Sehingga kini kajian mengenai hirudin adalah dari lintah Benua Eropah, *Hirudo medicinalis*. Ia boleh digunakan dalam merawat beberapa jenis penyakit thrombotik seperti rawatan bagi pesakit jantung dan semasa pembedahan. Teknik-teknik penulenan yang dijalankan melibatkan teknik-teknik asas ekstraksi protein, melibatkan pemendakan garam NH_4SO_4 , sistem elektroforesis, ultracentrifuge, low chromatography column, Rotofor dan penulenan jitu HPLC.

Pendahuluan

Hirudinaria manillensis adalah sejenis lintah yang boleh didapati di kawasan Asia Tenggara termasuk negara China, India dan Sri Lanka. Di Malaysia lintah ini dikenali sebagai lintah kerbau (406 th Medical Lab. Special Report., 1968). Hirudin adalah sejenis protein antikoagulan yang dirembeskan oleh kelenjar liur lintah dan dikeluarkan semasa ia menggigit mangsa. Inilah sebabnya mengapa luka yang disebabkan oleh gigitan lintah terus berdarah selepas beberapa jam (sehingga 4 jam) terkena gigitan (Sawyer R.T., 1991).

Sehingga kini tidak banyak kajian mengenai lintah tempatan dilakukan. Data yang berikut adalah mengenai hirudin yang diperolehi dari lintah Eropah, *Hirudo medicinalis*. Hirudin adalah protein yang sangat spesifik terhadap thrombin (Baskova I.P., et al., 1983). Nilai K_i hirudin terhadap thrombin adalah serendah 0.82×10^{-12} mol/l (Dodt J., et al., 1984). Thrombin adalah enzim yang merangsang pembekuan darah, apabila thrombin direncat maka pembekuan darah tidak akan berlaku. Hirudin juga adalah protein yang sangat stabil terhadap suhu dan pH yang sangat tinggi, mengandungi 65 atau 66 jujukan asid amino dengan 3 ikatan disulfida (Harvey R.P., et al., 1986). Ketiga-tiga ikatan disulfida itu terletak di dalam kawasan 39 residu pertama di terminal amino, manakala terminal karboksil pula sangat asidik dengan 5 asid amino asidik di 9 residu yang terakhir. Tapak aktif adalah dimana residu Lysine diapit oleh 2 residu Proline. Struktur inilah yang dikatakan memainkan peranan penting semasa interaksi hirudin-thrombin (Chang J.-Y., 1983).

Dari segi perubatan hirudin adalah lebih baik dari bahan antikoagulan lain kerana ia adalah immunogen yang sangat lemah dan tidak merangsang tindakbalas allergik (Klocking H.P., et al., 1988). Dos-dos yang besar kepada manusia dan haiwan tidak memberikan kesan sampingan malah pembuangan hirudin dari sistem darah melalui urin adalah sangat cepat dimana dalam masa 24 jam sahaja separuh dari hirudin yang disuntik telah dibuang (Bichler J., et al., 1988). Berbeza dengan antikoagulan lain seperti heparin selain dari harganya yang mahal ia juga memberi kesan sampingan seperti pendarahan dan 'thrombocytopaenia' bila digunakan didalam rawatan thrombotik (Walenga J.M., et al., 1990). Heparin juga memerlukan ko-faktor, antithrombin III (AT III) untuk bertindakbalas (Markward F., 1988). Antikoagulan sintetik yang biasa digunakan untuk menggantikan heparin adalah sulfonate polystyrene dan sulfonate polyethylene yang juga mempunyai sifat seperti heparin iaitu mahal dan memerlukan ko-faktor (Fougnot C., 1979).

Methodologi

Ekstrak Lintah

Pengekstrakan lintah dilakukan dengan pengubahsuaian kaedah Harvey R.P., et al.. 1986 dimana lintah dibekukan dengan Nitrogen cecair dan dihancurkan hingga menjadi debu sebelum dihomogenkan didalam larutan penimbal fosfat pH 7.0. Larutan ekstrak ini kemudiannya diemparkan pada 15K rpm selama 30 min dan supernatant ekstrak ini dikumpulkan.

Ujian Protein

Ujian protein dilakukan ke atas supernatan yang dikumpulkan tadi untuk menentukan jumlah protein yang diperolehi bagi setiap gram lintah. Ujian yang dilakukan adalah mengikut konsep Bradford dengan menggunakan reagen Bio-Rad. Ujian penentuan protein dengan kaedah ultra lembayung pada bacaan 280 dan 260 nm turut dilakukan.

Proses Nyahgaram

Econo-pac 10DG dari BioRad digunakan untuk menukarkan garam pengekstrakan iaitu garam fosfat kepada larutan penimbal TSM untuk digunakan semasa proses elektroforesis. Fraksi sebanyak 2 ml dikumpulkan dan fraksi yang mempunyai bacaan O.D. yang tinggi pada 280nm dikumpulkan untuk ujian elektroforesis dan ujian ATU .

Pengasingan dengan Rotofor (BioRad)

Pengasingan ini menggunakan konsep pengasingan mengikut pH atau pI. Di akhir proses, terdapat 20 fraksi yang berbeza pH dan bacaan O.D. diambil pada 280nm. Fraksi yang mengandungi bacaan tinggi dikumpulkan dan dibuat analisa elektroforesis serta ujian ATU .

Pengasingan dengan 'Continuous Elution Chromatograph'

Prep Cell Model 451 BioRad dengan 15% T, 2.7% C SDS-PAGE digunakan untuk proses ini. Fraksi sebanyak 2 ml dikumpulkan dan bacaan O.D. pada 280nm diambil. Fraksi yang mengandung bacaan tinggi dikumpulkan untuk analisa elektroforesis dan ujian ATU

Analisa Elektroforesis

15% T, 2.7% C SDS-PAGE digunakan untuk analisa berat protein dari pengekstrakan, selepas penyahgaraman, selepas pengasingan dengan rotofor dan pengasingan chromatografi bagi mengesahkan protein hirudin yang mempunyai berat molekul yang rendah dikumpulkan dan ditulinkan melalui proses-proses yang tersebut di atas

Ujian Anti Thrombin Unit (ATU)

Ujian ATU dilakukan mengikut modifikasi kaedah Chang, J.-Y., 1983 dan Mao, S.J.T. et al., 1987 yang mana Chromozym TH digunakan sebagai substrat seperti dalam kaedah ELISA.

Ujian 'High Performance Liquid Chromatograph' (HPLC)

Ujian ini dilakukan diakhir peringkat penulenan untuk mendapatkan hirudin tulen sebelum penjujukan dapat dilakukan.

Hasil dan Perbincangan

1. Beberapa parameter kawalan ditetapkan bagi sampel lintah yang diselidiki:

a) lokasi sampel

Sampel lintah diambil dari dua daerah iaitu dari Negeri Sembilan dan Pahang yang terdiri dari lintah sawah dan lintah paya dari spesis yang sama.

b) Berat purata setiap lintah yang dikaji adalah 3.0 - 4.0 gram

c) Setiap sampel dibiarkan kelaparan (starvation) dari waktu diambil hingga pengekstrakan protein

Keputusan

Protein ekstraksi lintah adalah modifikasi kaedah Harvey, R.P., et al., 1986. Disebabkan jumlah lintah yang sedikit dan untuk mendapatkan kehomogenan tisu yang baik cecair Nitrogen digunakan untuk pemecahan tisu-tisu lintah. Kepekatan purata protein yang didapati adalah 85 mg/gm lintah, berbanding 50 mg/gm lintah mengikut kaedah penggunaan homogenizer. Kepekatan protein jumlah ditentukan mengikut asai Bradford menggunakan Bio-Rad Reagent (graf 1) dengan menggunakan protein BSA sebagai kawalan.

2. Analisa Elektroforesis (Rajah 1 dan 2)

Dari kajian didapati jenis protein elektroforesis yang paling sesuai adalah mengikut kaedah Laemmli menggunakan 15% T, 2.7% C SDS-PAGE.

Dari analisa didapati:

a) Setiap jenis sampel lintah dari lokasi berbeza mempunyai profail protein elektroforesis yang sama. Yang mana pada Rajah 2 di dapati jalur no. 1 dan 3 adalah dari ekstrak protein lintah sawah dari Negeri Sembilan manakala jalur no. 2 dan 4 adalah dari ekstrak protein lintah paya dari Pahang.

b) Banyak bands protein bermolekul tinggi masih didalam ekstraksi protein jumlah dimana pada rajah 1, jalur no. 1, 2, 3, 7, 8 dan 9 adalah protein standard marker dan jalur no. 4, 5, 6, 10 dan 11 adalah dari ekstrak protein lintah yang belum dibersihkan dengan proses penyahgaram menunjukkan banyak protein bermolekul tinggi seperti juga pada Rajah 2 yang mana pada jalur no. 5 menunjukkan protein standard marker bermolekul tinggi dan bands dari ekstrak protein lintah pada jalur 1 hingga 4 menunjukkan banyak bands pada lingkungan kawasan yang sama.

c) Penulenan separa dengan kaedah penyahgaram banyak membersihkan band-band protein yang didapati. Ini dapat dilihat dengan perbesaan di antara Rajah 1 dan Rajah 2 dimana bands pada rajah 2 lebih jelas.

Keputusan

Kaedah pemendakan dengan menggunakan garam NH_4SO_4 harus dilakukan terhadap protein ekstrak bagi menghilangkan protein-protein bermolekul besar seperti organel-organel dan ribosome. Oleh itu kita dapat menyelidiki hanya protein bermolekul rendah termasuk hirudin. Sebelum analisa elektroforesis, protein ini mesti dibersihkan lagi untuk mendapatkan penulenan yang lebih baik.

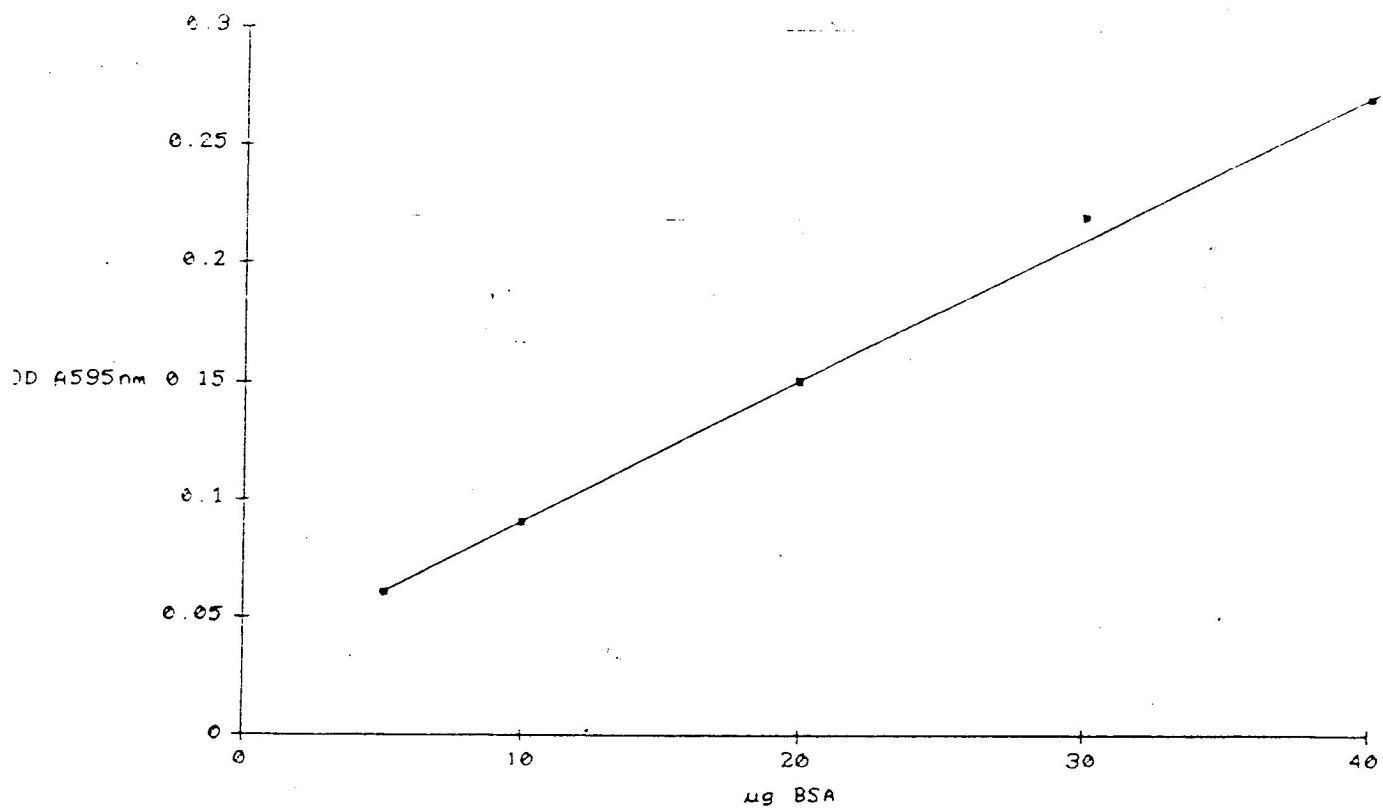
3. Analisa Rotofor dan Prep Cell (BioRad)

Penggunaan alat Rotofor ('ion exchange- pI') dan Prep Cell ('continuous electrophoresis') adalah untuk penulenan protein secara 'preparative' sementara elektroforesis SDS-PAGE adalah untuk peringkat 'analytical'. Dari analisa awal Rajah 3 didapati bahawa penulenan melalui Rotofor dapat memisahkan protein

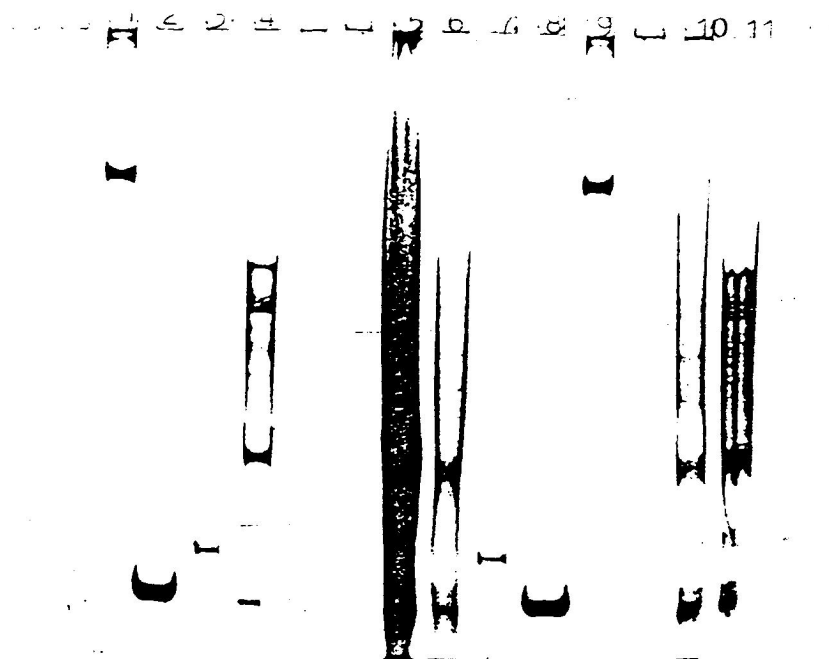
bermolekul rendah dengan lebih berkesan. Dimana pada 1, 2, 3 dan 4 adalah protein standard marker dan jalur no. 5 dari ekstrak protein lintah yang belum dinyahgaram dan jalur no. 6 selepas proses penyahgaram. Manakala jalur no. 7 hingga 12 menunjukkan hasil setelah ditulenkan melalui Rotofor. Keputusan yang 'reproducible' amatlah diperlukan.

Rumusan

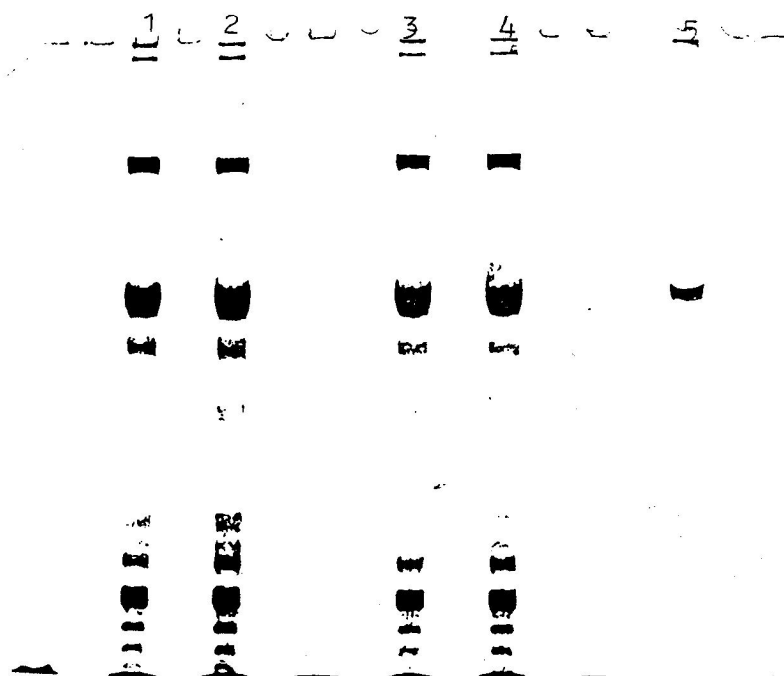
Sistem lengkap penulenan protein adalah seperti di dalam lampiran. Teknik-teknik penulenan perlu diperkukuhkan lagi dengan ulangan sebanyak boleh bagi setiap peringkat. ATU asai hanya dilakukan apabila selesai segala proses penulenan kerana perbandingan perbezaan spesifik aktiviti antara hirudin lintah benua Eropah daripada lintah tempatan dapat dilakukan. Jika ada perbezaan spesifik aktiviti ATU maka penjujukan akan dijalankan.



GRAF 1 : MENUNJUKKAN PROTEIN STANDARD (BSA) YANG
MANA DIBUAT PENENTUAN 'TOTAL PROTEIN'
BERDASARKAN KAEDAH BRADFORD



RAJAH 1 : SDS-PAGE 15% T, 2.7% C YANG MENUNJUKKAN 'SMEAR' PADA 'CRUDE EXTRACT' LINTAH



RAJAH 2 : SDS-PAGE 15%T, 2.7% C YANG MENUNJUKKAN BANDS YANG LEBIH BERSIH DAN JELAS SELEPAS PROSES NYAHGARAM DILAKUKAN

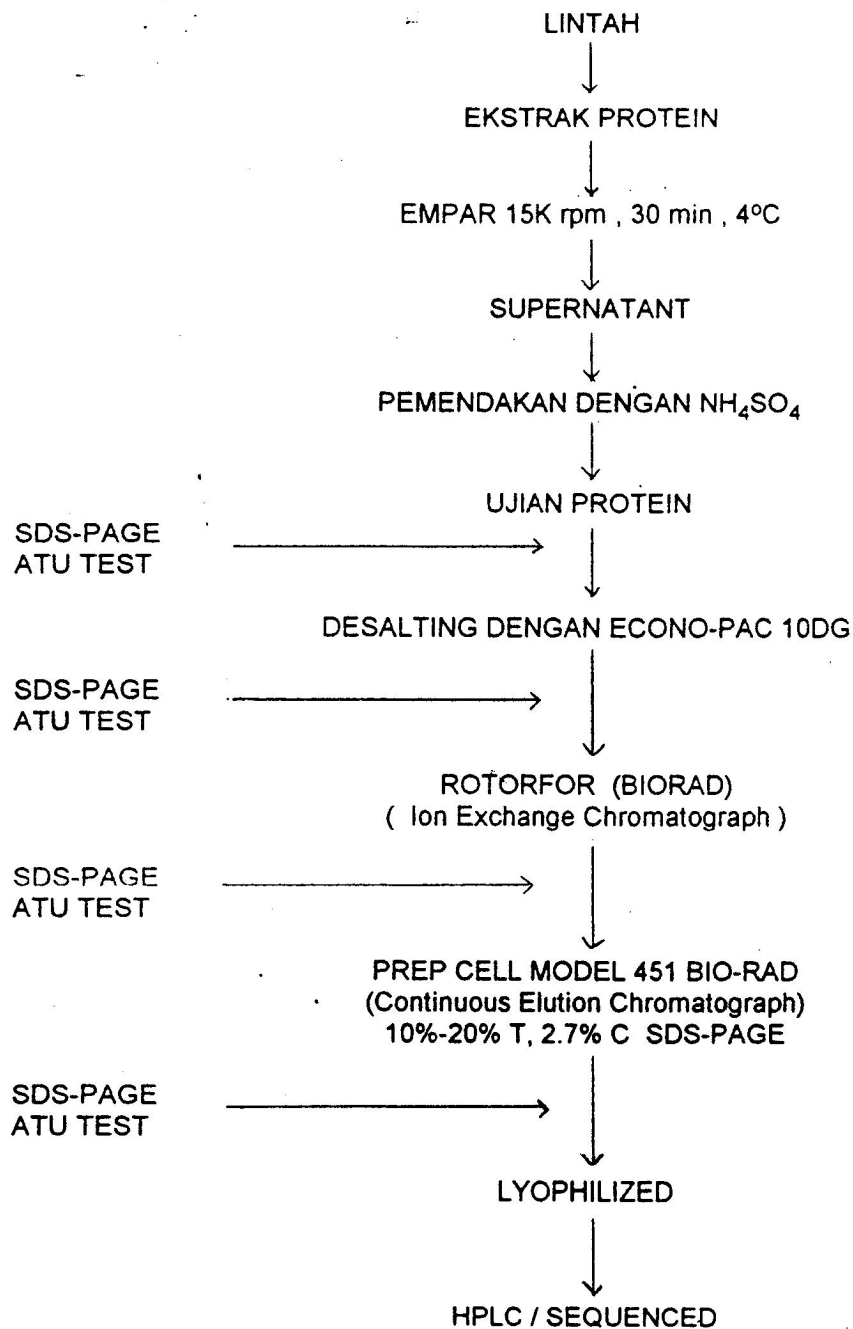
1 2 3 4 L L 5 L 6 7 8 9 10 11 12



RAJAH 3 : SDS-PAGE 15% T, 2.7% C YANG MENUNJUKKAN PENYINGKIRAN PROTEIN BERMOLEKUL TINGGI OLEH ROTORFOR

DIMANA : LANE 1-4 ADALAH PROTEIN MARKER
 LANE 5 ADALAH 'CRUDE EXTRACT' LINTAH
 LANE 6 ADALAH 'CRUDE EXTRACT' YANG TELAH DINYAH GARAM
 LANE 7-12 ADALAH FRAKSI YANG MENUNJUKKAN BACAAN OD TINGGI SELEPAS ROTORFOR

SISTEM LENGKAP ANALISA PENULENAN PROTEIN HIRUDIN



Kaedah penulenan dan pengasaan diambil dari Bagdy D., et al. , 1973., Baskova I.P., et al. , 1983., Chang J.-Y., 1983., Harvey R.P., et al. , 1986., Mao S.J.T., et al. , 1987. dan Dodt J., et al. , 1986.

RUJUKAN

- Bagdy, D., et al., 1973, Large Scale Preparation of Hirudin, Thrombosis Res., 2, 229-38.
- Baskova, I.P., et al., 1983, Hirudin from Leech Heads & Whole Leech and Pseudo-hirudin from Leech Bodies, Thrombosis Res., 30, 459-67.
- Bichler, J., et al., 1988, Pharmacokinetics & Pharmacodynamics of hirudin in Man after Single Subcutaneous and Intravenous administration. Arzneim-forsch. 38(5), 704-10.
- Chang, J.-Y., 1983, The Functional Domain of Hirudin, A Thrombin-Specific Inhibitor, FEBS LETT., 164(2), 307-13.
- Dodt, J., et al., 1984, The Complete Amino Acid Sequence of Hirudin, A Thrombin Specific Inhibitor, FEBS LETT., 165(2), 180-3.
- Dodt, J., et al., 1986, Isolation & Characterization of Hirudin Isoinhibitors & Sequence Analysis of Hirudin PA, Biol. Chemistry., 367, 803-11.
- Fougnot, C., 1979, New Heparin Like Insoluble Materials: Part 1., Annals. of Biomedical Eng., 7, 429-39.
- Harvey, R.P., et al., 1986, Cloning & Expression of a cDNA Coding for the Anticoagulant Hirudin from the Bloodsucking Leech, Proc. Natl. Acad. Sc. USA., 83, 1084-8.
- Klocking, H.P., et al., 1988, Toxicological Studies with Recombinant Hirudin, Folia Haematol., 115, 75-82.
- Mao, S.J.T., et al., 1987, Rapid Purification & Revised Amino Sequence of Hirudin., Analytical-Biochem., 161, 514-8.
- Markward, F., 1988, The Comeback of Hirudin, an Old Established Anticoagulant Agent. Folia Haematol., 115, 10-23.
- Sawyer, R.T., 1991, Thrombolytics & Anticoagulants From Leeches, Bio/Technol., 9, 513-8.
- Walenga, J.M., et al., 1990, Recombinant Hirudin as An Antithrombotic Agents. Drugs of the Future., 15(3), 267-80.
- 406th Medical Laboratory special report on Blood Sucking Asian Leeches Of Families Hirudidae & Haemadipsidae, July 1968. United States Army Medical Command, Japan.